

*Bacillus megaterium*이 생산하는 γ -cyclodextrinase의 정제와 특성에 관한 연구

오병택¹ · 김용휘^{1*} · 차연수²

¹전북대학교 농과대학 농화학과, ²전북대학교 의과대학 생화학교실

초록 : *Bacillus megaterium*이 생산하는 γ -cyclodextrinase(γ -CDase) 염석, DEAE-trisacryl, Ultrogel AcA 34 및 Ultrogel HA column chromatography 등의 방법으로 부분정제한 결과 specific activity는 120.4 units/mg protein으로 조효소액에 비하여 125.4배 정제되었다. 부분정제한 γ -CDase는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의해 2개의 band로 나타났으며 band I과 band II의 분자량은 각각 64,000과 50,000이었다. γ -CDase의 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 60°C 이었고, 45°C 이하의 온도와 pH 6.0~9.0에서 안정하였으며, γ -CD에 대한 Km값은 0.903 mM이었다. Mg^{2+} 와 Mn^{2+} 이온에 의해 활성이 증가한 반면, Hg^{2+} 와 Cu^{2+} 에 의해서는 활성이 현저하게 감소되었다. γ -CDase는 α -CD와 β -CD에는 거의 활성이 없었고, γ -CD에는 매우 높은 활성을 나타내었으며, 이의 분해 생성물은 주로 glucose와 maltose이었다(1994년 12월 9일 접수, 1995년 2월 6일 수리).

서 론

Cyclodextrin (CD)은 1891년 Villiers 등에¹⁾ 의하여 발견되었고, 그 후 CD 생산효소를 분비하는 세균의 동정과 검색, CD 생산효소의 분리 정제,²⁻¹⁴⁾ CD의 조제와 결정화,^{4,15,16)} CD의 구조와 물리화학적 성질에 대한 기초적인 연구뿐만 아니라,^{17,18)} CD의 이용분야 개발에 관련된 연구도 활발히 진행되고 있다.^{19,20)} CD는 glucose분자 6~12개가 α -1,4-glucoside 결합에 의하여 환상으로 연결된 비환원성 maltooligosaccharide로서, glucose분자 6개로 이루어진 α -CD, 7개의 β -CD 및 8개의 γ -CD가 생산되고 있다.¹⁷⁾ CD는 환상구조로 밑이 없는 양동이 모양이다.¹⁷⁾ CD의 최대특성은 이 환상구조의 바깥쪽이 친수성을 나타내며 내부는 소수성을 나타내기 때문에, 이 내부에 油性物質을 받아들여 포접화합물 (inclusion complex)을 형성하는 것이다.²¹⁾ 이러한 CD의 특성을 이용하여 식품, 의약품, 효소화학, 화학공업, 농약등 광범위한 분야에 활용이 가능하나 생성수율이 비교적 낮고, 일반적으로 α -, β -, γ -CD가 혼합되어 생성된다. 공동의 크기에 따라, 즉 CD의 종류에 따라 응용분야가 달라지므로 CD류의 분리 정제가 필요하나 그 과정이 어려워 일부 식품에서는 혼합CD를 사용하고 있는 실정이다. 따라서 CD류의 분리 정제는 매우 중요한 과제로 되어 있다.

CD의 분리 정제를 위해 CD혼합액중의 특정 CD만을 효소적으로 분해시키는 것이 필요하다고 생각되는 바, 본 연구에서는 *Bacillus megaterium*으로부터 γ -CD만을 특이적으로 분해하는 γ -CDase를 분리, 부분정제하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

공시균주로는 *Bacillus megaterium* KFCC 11855를 한국중균협회에서 분양받아 사용하였다. Maltose, 전기영동용시약 및 사용된 표준단백질 MW-SDS-200Kit는 Sigma社, α -, β -, γ -cyclodextrin은 일본식품화학회사 제품이었으며, 기타 시약은 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

미생물의 배양 및 조효소액의 조제

*Bacillus megaterium*의 생육을 향상 시키기 위하여 Nutrient agar 배지에 두차례에 걸쳐 40°C에서 2일간 정치배양하였으며 그 후 Nutrient Broth 배지에 접종하여 40°C에서 24시간 진탕배양 (100 rpm) 하였다. 한편, oat meal 1g, wheat bran 10g, polypepton 1g, $CaCO_3$ 1g, KH_2PO_4 0.2g, fresh potato 1g을 혼합하여 수분함량이 53%가 되도록 조절하고 살균 (121°C, 1.2 kg/cm², 20 min)한 배지에 상기의 진탕배양액 1.4 ml를 접종하여 40°C에서 5일간 정치배양하였다. 배양 후 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0, 이하 pH동일) 100 ml를 가하여 30분간 교반하고 1시간 방치한 후, 꺼즈로 여과하고 여과액을 원심분리(10,000 ×g, 4°C, 20 min, 이하 동일)하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

γ -CDase의 정제

조효소액은 염석 및 투석, DEAE-trisacryl column chromatography, 동결건조, Ultro AcA 34 gel filtration, Ultro

찾는말 : γ -cyclodextrinase, purification, cyclodextrin, enzyme activity.

*연락처

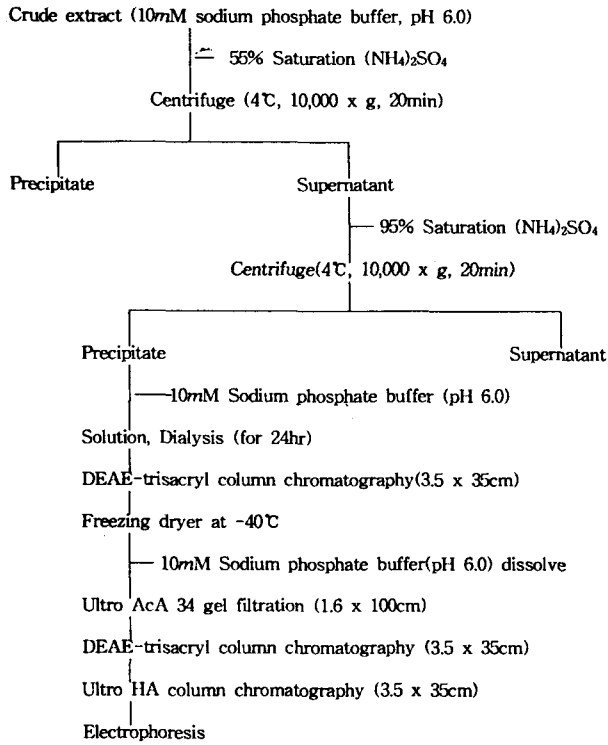


Fig. 1. Schematic diagram for the purification of the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*.

HA column chromatography 등의 방법으로 정제하였으며, 그 개요는 Fig. 1과 같다. 또한 정제 확인을 위해 전기영동법을 이용하였다.

조효소액에 55%의 포화용액이 되도록 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 4°C에서 1시간 교반한 후, 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 그 상등액에 95% 포화용액이 되도록 다시 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 서서히 가하여 4°C에서 1시간 교반한 후, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물에 10 mM sodium phosphate buffer를 가하여 용해시킨 후 dialysis tube를 사용하여 동일 완충액에서 24시간 교반하면서 투석하였다. 투석하는 동안 완충액은 8시간 마다 교환해주었고, 투석 후 tube 내액의 불용성물질을 원심분리하여 제거하였다.

염석 및 투석과정을 통하여 얻은 농축액(35 ml)을 10 mM sodium phosphate buffer로 미리 평형화 시킨 DEAE-trisacryl column(3.5×35 cm)에 주입하였다. 10 mM sodium phosphate와 0.7 M NaCl을 함유한 10 mM sodium phosphate buffer를 linear gradient로 혼합하여 분당 1 ml의 유속으로 용출시켰다. 용출액을 fraction collector로 6 ml씩 분취하여 각 분획의 단백질은 Lowry법²²⁾을 이용하여 측정하였고, Miller의 환원당 정량법²³⁾으로 효소활성이 있는 분획을 모았다. 모은 활성부분은 투석하여 동결건조한 후, 10 mM sodium phosphate buffer로 용해시켜 gel filtration을 실시하였다.

동결건조에서 얻은 농축액을 10 mM sodium phosphate buffer로 미리 평형화 시킨 Ultrogel AcA 34 column

(1.6×100 cm)에 주입하고 평형화에서 사용한 완충액으로 분당 0.5 ml의 유속으로 용출시키면서 5 ml씩 분취하고, 각 분획의 단백질과 활성을 측정하여 활성분획을 모은 후 투석을 실시하였다.

Gel filtration에서 얻은 효소액을 제1차에서와 같은 방법으로 실시하여 활성부분을 모은 후, 투석을 실시하였다.

제2차 DEAE-trisacryl column chromatography에서 얻은 효소액을 5 mM sodium phosphate buffer로 미리 평형화 시킨 Ultrogel HA column(3.5×35 cm)에 주입하였다. 5 mM sodium phosphate와 500 mM sodium phosphate buffer를 linear gradient로 혼합하여 분당 0.5 ml의 유속으로 용출시켰다. 용출액을 fraction collector로 5 ml씩 분취하고 각 분획의 단백질과 효소활성을 측정하여 활성분획을 모아 효소의 특성실험에 사용하였다.

효소활성측정

γ -CDase의 활성은 Miller의 환원당 정량법²³⁾을 사용하였다. 즉, 기질용액 (0.5% γ -CD in 10 mM Na-phosphate buffer, pH 6.0) 1 ml에 효소용액 50 μ l를 넣고 20 min 동안 45°C에서 반응시킨 후, 여기에 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)용액 1 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 이 용액을 다시 100°C에서 15분간 끓여 발색시킨 후, 10 ml의 증류수를 넣어 희석시킨 다음 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. Maltose를 사용하여 같은 방법으로 실험하여 표준곡선을 작성하였으며, 효소의 단위는 γ -CD로 부터 maltose를 1분당 1 mM 생산하는 활성을 1 unit(U)로 정하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry등의 방법²²⁾으로 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli²⁴⁾의 방법에 따라 실시하였다. 정제된 γ -CDase를 같은 양의 2X sample buffer를 섞어 5분간 끓인 후, 5%(w/v) stacking gel과 12.5%(w/v) running gel로 구성된 SDS-polyacrylamide gel에 주입하고 전기영동을 실시하였다. 분자량 측정을 위해 사용된 표준단백질은 carbonic anhydrase(M.W. 29,000), egg albumin(M.W. 45,000), bovine plasma albumin(M.W. 66,000), phosphorylase(M.W. 97,400), β -galactosidase(M.W. 116,000), myosin(M. W. 205,000) 등이었다.

결과 및 고찰

γ -CDase의 정제 및 분자량 측정

γ -CDase의 정제

Specific activity가 0.96(unit/mg protein)인 조효소액을 재료 및 방법에서 기술된 대로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염석한 다음

dialysis하여 얻은 효소액을 DEAE-trisacryl column, 동결건조, Ultrogel AcA 34, Ultrogel HA column chromatography 등의 방법으로 정제한 결과는 Table 1과 같다. 최종 단계로 실시된 Ultrogel HA column chromatography의 결과는 Fig. 2과 같고 활성이 있었던 Fraction No. 106 % 122의 분획을 모아 효소의 특성실험에 사용하였다. 이때 정제효소의 specific activity는 조효소액보다 125.4배 증가하였고 회수율은 7.6%였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

전기영동을 통하여 정제효소의 정제도를 조사한 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 SDS-PAGE에서 2개의 band를 나타낸 것으로 보아 최종적으로 얻어진 정제효소액에는 한가지의 다른 단백질이 포함되어 있는 것으로 생각된다. SDS-PAGE로 부터 측정된 정제효소의 분자량은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 약 64,000(Band I)이나 50,000(Band II)인 것으로 사료된다. 이는 SDS-PAGE로 부터 측정된 Band I의 분자량이 *Bacillus stearothermophilus* TC-60의 CGTase가 68,000이었고⁷⁾, *Bacillus coagulans*의 cyclodextrinase는 62,000이었다는 보고¹⁰⁾와 유사한 것으로 생각된다. 그러나 2개의 Band중 어느쪽이 γ -CDase인지는 밝히지 못하였다.

γ -CDase의 일반 특성

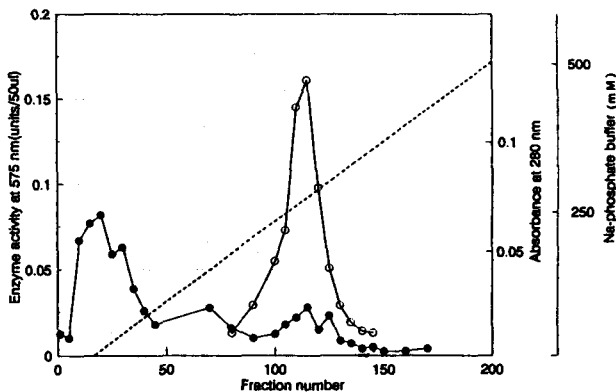


Fig. 2. Column chromatography on Ultrogel HA. Absorbance at 280 nm (closed circles), γ -cyclodextrinase activity(open circles), sodium-phosphate buffer gradient(dotted line).

최적 pH

각 pH에서의 효소활성은 pH 2.0에서 pH 12.0까지 pH별로 조제한 Britton-Robinson buffer 2 ml에 0.5% γ -CD용액 1 ml와 효소액 0.1 ml를 가하고 45°C에서 20분간 반응시킨 다음, γ -CD의 분해에 대한 효소의 활성을 측정하여 상대활성도로 나타내었다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 6.0에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 4.0과 pH 7.5에서는 효소의 상대활성이 50% 이하였다.

CD를 분해시키는 효소로 알려진 *Bacillus macerans*의 cyclodextrinase는 최적 pH가 6.2~6.4²⁵⁾, *Bacillus megaterium*의 CGTase는 pH 5.2~6.2⁷⁾, *Pseudomonas*의 α -amylase는 pH 5.5⁹⁾, *Bacillus stearothermophilus* TC-60의 CGTase는 pH 6.0⁷⁾, *Bacillus coagulans*의 cyclodextrinase는 pH 6.2¹⁰⁾로 보고된바 있어 본 실험에서의 γ -CDase의 최적 pH는 이와 유사한 경향이였다.

pH 안정성

Britton-Robinson buffer로 조제한 각 pH별 완충액 0.4 ml에 효소액 0.1 ml를 가하고 45°C에서 2시간 방치한 후 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 2 ml와 0.5%

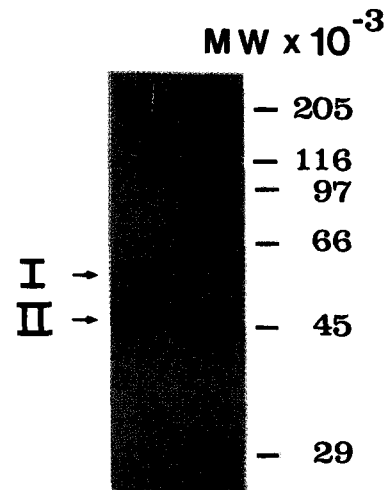


Fig. 3. Molecular weight analysis of purified γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. γ -Cyclodextrinase purified through the Ultrogel HA was analyzed by electrophoresis on a 12.5%(w/v) SDS-polyacrylamide gel. Lane 1, purified γ -cyclodextrinase; lane 2, molecular weight standards.

Table 1. Purification of γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*(KFCC 11855)

| Purification step | Volume (ml) | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg protein) | Yield (%) | Purification (fold) |
|--|-------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----------|---------------------|
| Crude extract | 500 | 4,118 | 4,282 | 0.96 | 100 | 1.0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (55~95%) | 35 | 2,637 | 395 | 6.67 | 64.0 | 6.9 |
| DEAE-trisacryl | 135 | 1,339 | 68 | 19.7 | 32.5 | 20.5 |
| Ultrogel AcA34 | 61 | 807 | 34.8 | 23.2 | 19.6 | 24.2 |
| DEAE-trisacryl | 76 | 345 | 3.5 | 98.5 | 8.4 | 102.6 |
| Ultrogel HA | 121 | 313 | 2.6 | 120.4 | 7.6 | 125.4 |

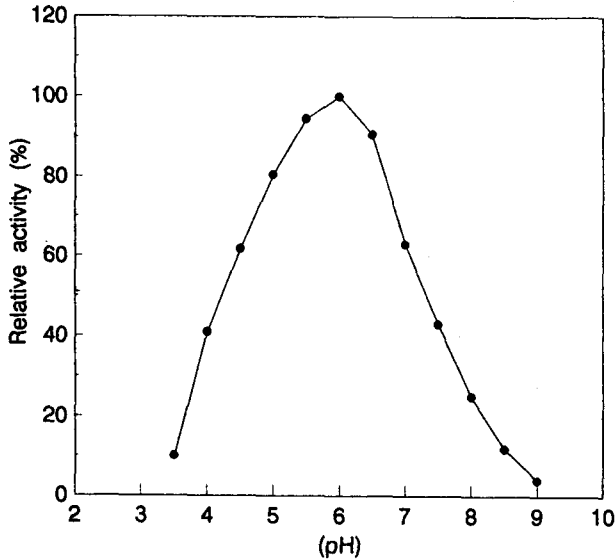


Fig. 4. Effect of pH on activity of the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. γ -Cyclodextrinase was assayed at various pH as described in "Results and Discussion."

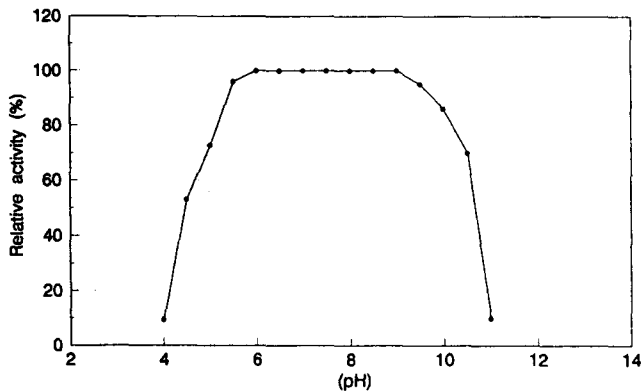


Fig. 5. Effect of pH on stability of the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. γ -Cyclodextrinase was incubated at various pH and assayed as described in "Results and Discussion."

γ -CD용액 1 ml를 가하고 45°C에서 20분간 반응시킨 다음, 그 잔존활성을 측정하여 상대활성도로 나타내었다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 5.5~9.0에서 높은 활성을 유지하였으나, pH 4.0 이하와 pH 11.0 이상에서는 효소활성이 거의 없었다.

CD분해효소로 알려진 *Bacillus coagulans*의 cyclodextrinase는 pH 6.0~7.3¹⁰⁾, *Bacillus stearothermophilus* TC-60의 CGTase는 pH 7.0~9.2⁷⁾, *Bacillus megaterium*의 CGTase는 pH 7.0~10.0⁷⁾, *Pseudomonas*의 α -amylase는 pH 4.5~7.5에서 각각 안정하였다는 결과⁵⁾와 다소 상이한 경향을 나타내었다.

최적 온도

10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 녹인 0.5% γ -CD용액 1 ml에 효소액 0.1 ml를 가하고 20°C에서 90°C까지 10°C 간격의 각 온도에서 20분간 반응시킨 다음,

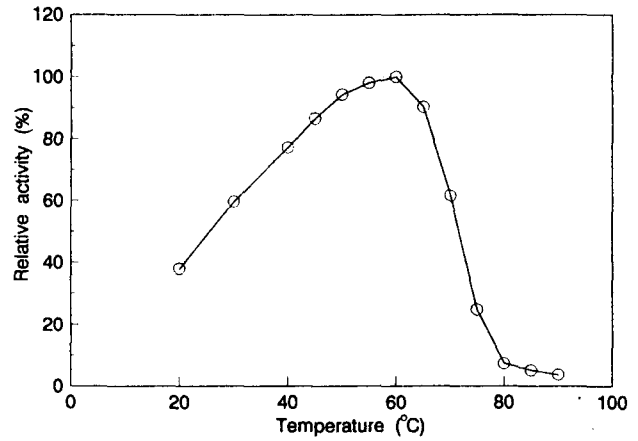


Fig. 6. Effect of temperature on activity of the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. γ -Cyclodextrinase was assayed at various temperature as described in "Results and Discussion."

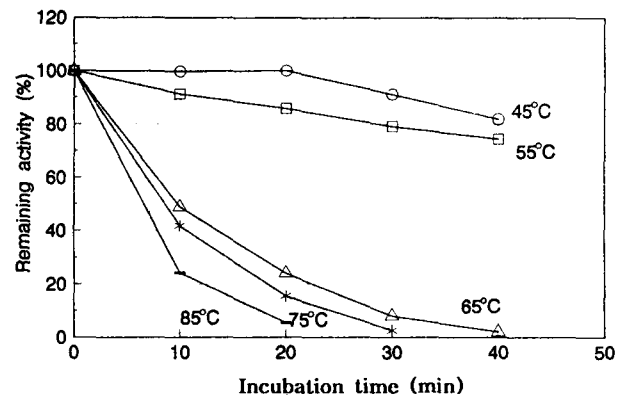


Fig. 7. Effect of temperature on stability of the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. γ -Cyclodextrinase was incubated at various temperature and assayed as described in "Results and Discussion."

그 활성을 측정하여 상대활성도로 나타내었다. 각 온도에서 γ -CDase의 상대활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 정제효소의 상대활성은 20°C에서부터 점차로 증가하여 60°C에서 최고 활성을 나타내었고 그 이상의 온도에서는 점차로 감소되었으며, 80°C에서의 상대활성도는 10% 이하로 감소하였다. 이는 *Bacillus coagulans*의 cyclodextrinase에서 50°C¹⁰⁾와 *Pseudomonas*의 α -amylase에서 55°C⁵⁾와 *Bacillus megaterium*의 CGTase에서 55°C⁷⁾보다는 높았으나 *Bacillus stearothermophilus* TC-60의 CGTase에서 70°C⁷⁾보다는 낮았다.

열 안정성

각 온도에서 보존시간에 따른 활성도의 변화를 알아보기 위하여 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) 2.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가하고 45°C에서 85°C까지 10°C 간격으로 40분간 보존하면서 경시적으로 보존액을 0.6 ml씩 취하여 얼음에 냉각한 다음, 0.5% γ -CD 용액 1 ml를 가하고 45°C에서 20분간 반응시킨 후, 효소활성을

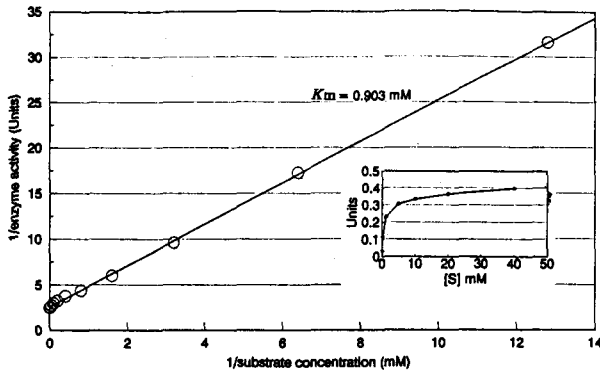


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. γ -Cyclodextrinase was assayed at various concentration of γ -cyclodextrin as substrate. The inset shows velocities of γ -cyclodextrin degradation.

Table 2. Effect of metal ions on the activity of γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*(KFCC 11855)

| Metal ions | Relative activity (%) |
|-------------------|-----------------------|
| None | 100 |
| MgCl ₂ | 122 |
| CaCl ₂ | 90 |
| ZnSO ₄ | 40 |
| HgCl ₂ | 0 |
| BaCl ₂ | 91 |
| CuSO ₄ | 8 |
| FeSO ₄ | 50 |
| MnCl ₂ | 142 |

측정하여 이를 상대활성도로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 7과 같다. 본 효소는 45°C에서 20분간 보존한 경우에도 최고의 활성을 유지하였으며, 40분간 보존하여도 80% 이상의 활성을 유지하였다. 그러나 55°C에서 20분간에 85%의 상대활성을, 40분간에 74%의 상대활성을 나타내었으나 65°C에서는 빠르게 실활되어 10분간에 50% 이상이 실활되었고 85°C에서 10분간에 75% 이상이 실활되었다. 이는 *Bacillus macerans*와 *Bacillus megaterium*의 CGTase는 55°C 이하에서 안정하였고⁷⁾ *Bacillus stearothermophilus* TC-60의 CGTase와 *Pseudomonas*의 α -amylase는 50°C 이하에서 안정하였으며, 60°C에서 30분간 보존할 경우 거의 실활된다고 보고하였으나^{5,7)} 본 효소는 45°C 이하에서 안정하였음을 알 수 있었다.

기질농도의 영향

기질농도와 효소활성도의 관계를 알아보기 위하여 γ -CD의 농도를 0.078 mM~40 mM로 각각 조제한 기질 용액에서 효소 활성을 조사하여 Lineweaver-Burk의 방법²⁰⁾에 따라 plot한 결과는 Fig. 8과 같다. γ -CD의 농도가 5 mM까지는 효소활성도 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 효소활성이 매우 완만하게 증가하였다. Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot하여 구한 Km치는 0.903×10^{-3} M이었다. 이 수치는 *Bacillus coagulans* cyclodextrin-

Table 3. HPLC conditions for the identification of produced sugar

| | |
|-------------|--|
| Instrument | Model 246 Liquid Chromatographic system (Millipore Waters) |
| Column | μ v Bondapak/carbohydrate (4×300 mm I.D.) |
| Pump | Waters model 510 |
| Detector | RI (401) |
| Solvent | CH ₃ CN : H ₂ O (65 : 35, V/V) |
| Flow rate | 2.0 ml/min |
| Chart speed | 1 cm/min |
| Inj. volume | 50 μ l |

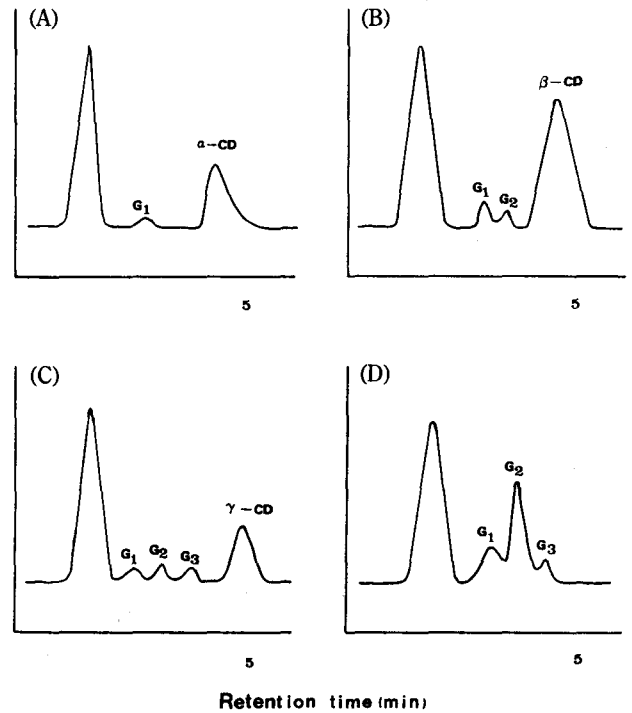


Fig. 9. HPLC chromatogram of produced sugars in the degradation of α -CD (A), β -CD (B), γ -CD (C, D) by the γ -cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*. CDs were incubated with the enzyme for 24 hr (A, B, D) and for 20 min.(C), respectively. G1, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose; α -CD, β -cyclodextrin; α -CD, β -cyclodextrin; γ -CD, γ -cyclodextrin.

nase의 γ -CD에 대한 Km치가 0.47×10^{-3} M이라는 Kitahata 등의 보고¹⁰⁾와 경향을 나타내었다.

금속이온의 영향

정제 효소액에 대한 각종 금속이온의 영향을 조사하기 위해 10 mM로 각각 조제한 MgCl₂, CaCl₂, ZnSO₄, HgCl₂, BaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MnCl₂용액 0.1 ml와 정제 효소 0.1 ml, 0.5% γ -CD 1 ml를 가하여 45°C에서 20분간 반응시킨 후, 그 상대활성도로 나타내었다. 그 결과 Table 2에서 보는바와 같이 γ -CDase는 Mg⁺² 뿐만 아니라 Mn⁺²에 의해서도 활성이 증가되었고, Hg⁺²와 Cu⁺²에 의해서는 거의 실활되었다.

γ -CDase의 작용특성

정제효소에 의한 CD류의 분해 내용을 알아보기 위하여 2% α -CD, β -CD, γ -CD용액 각 1 ml에 효소액 0.1 ml와 Britten-Robinson완충액(pH 6.0) 2 ml를 가하고 24 시간 동안 반응시킨 후 반응액 0.5 ml를 취하고 4% HCl 0.2 ml를 가하여 효소활성을 실험시킨 후 생성된 당과 잔존 CD를 Table 3 에서와 같은 조건의 HPLC로 분석하였으며, 작용시간에 따른 CD의 분해 생성물을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. α -CD는 반응 24 시간 후에도 분해되지 않았고, α -CD와 β -CD에 대한 HPLC의 chromatogram에 소량의 glucose나 maltose가 검출된 것은 α -CD(순도 98.5%)와 β -CD(순도 98 %)의 함유된 불순물이 나타난 것으로 판단되었다. 그러나 γ -CD의 분해는 20분 반응에서도 glucose, maltose, maltotriose가 생성되었고 분해되지 않고 남아있던 γ -CD도 24 시간 반응후에는 완전히 분해되었으며, 이의 생성물은 주로 glucose와 maltose, 그리고 소량의 maltotriose만이 검출되었다. 따라서 γ -CDase는 γ -CD에 기질특이성을 나타내며 그 생성물은 glucose, maltose, maltotriose임을 알 수 있었다.

또한 γ -CD의 분해로 반응 초기부터 glucose, maltose, maltotriose만이 검출된 것으로 보아 γ -CDase는 CD의 환을 decycling함과 동시에 glucose, maltose, maltotriose를 생성시키는 복합분해기작을 하는 효소로 추정되나 본 효소의 분해기작과 isoenzyme에 대해서는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Villiers, A. (1981) Isolation, empirical crude bacterial digest of starch. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **112**, 536.
- Kobayashi, S. and K. Kainuma (1981) Production and utilization of cyclodextrin. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **33**, 144-151.
- Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki (1978) Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose glucanotransferase. *Carbohydrate Research* **61**, 229-239.
- Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki (1974) Cyclodextrin forming enzyme of *Bacillus macerans*. *J. Jap. Starch Sci.* **21**, 131-137.
- Kato, K., T. Sugimoto, A. Amemura and T. Harada (1975) A *Pseudomonas* intracellular amylase with high activity on maltodextrins and cyclodextrins. *Biochim. Biophys. Acta* **391**, 96-108.
- Kitahata, S., N. Tsuyama and S. Okada (1974) Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agr. Biol. Chem.* **38**, 387-393.
- Kitahata, S. and S. Okada (1982) Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **29**, 7-12.
- Kitahata, S. and S. Okada (1982) Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **29**, 13-18.
- Kitahata, S., S. Yoshikawa and S. Okada (1978) Determination of α -, β - and γ -cyclodextrins by high performance liquid chromatography. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **25**, 19-23.
- Kitahata, S., M. Taniguchi, S. Beltran, D. Tsugimoto and S. Okada (1983) Purification and some properties of cyclodextrinase from *Bacillus coagulans*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1441-1447.
- Nakamura, N. and K. Horikoshi (1976) Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 935-941.
- Schwimmer, S. (1953) Evidence for the purity of schardingerdextrinogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 108-117.
- 김용휘, 심규광, 문영희 (1990) Cyclodextrin분해효소의 정제 및 그 특성. *한국농화학회지* **33**, 79-86.
- Park, C. S., E. J. Woo, S. U. Kuk, B. C. Seo, K. H. Park and H. Lim (1992) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. E1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 156-163.
- Kobayashi, S. (1975) Action mechanisms of *B. macerans* enzyme and preparation of cyclodextrins. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **22**, 126-132.
- Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki (1975) A new preparation method of cyclodextrins. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **22**, 6-10.
- Bender, M. L. and M. Komiyama (1978) Cyclodextrin chemistry. Springer-Verlag, U.S.A.
- Harata, K. (1979) Structure chemistry of cyclodextrin complexes. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **26**, 198-209.
- Kobayashi, S. and K. Kainuma (1981) Cyclodextrins. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **28**, 132-141.
- Kobayashi, S., K. Maruyama and K. Kainuma (1983) Some properties and application of branched cyclodextrins. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **30**, 231-239.
- French, D., A. O. Pully, J. A. Effenberger, M. A. Rougvie and M. Abdullah (1965) Studies on the schardinger dextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 153-160.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. L. Randall (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Miller, G. L. (1964) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Ann. Y. Sci.* **121**, 404.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature NB* **227**, 680-685.
- DePinto, J. A. and L. L. Comphell (1968) Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry* **7**, 121-125.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox (1993) In 'Principle of Biochemistry' p.211-218, Worth Publishers, Inc. NY, U.S.A.

Purification and Properties of γ -Cyclodextrinase from *Bacillus megaterium*(KFCC 11855)

Beyoung-Taek Oh¹, Yong-Hwi Kim^{1*} and Youn-Soo Cha²(¹*Department of Agricultural Chemistry, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea,* ²*Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School, Chonju 560-182, Korea*)

Abstract : The experiment was carried out to purify and to investigate the properties of the cyclodextrinase produced from *Bacillus megaterium* KFCC 11855. The enzyme was partially purified with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and chromatography on DEAE-trisacryl, Ultrogel AcA 34, DEAE-trisacryl and Ultrogel HA. The optimum temperature and pH of the purified enzyme were 60°C and 6.0, respectively. The enzyme was stable at the temperature of 45°C below and at the pH range of 6.0~9.0, respectively. The K_m value for γ -cyclodextrin was 0.903 mM. The enzyme activity was increased by Mg^{2+} and Mn^{2+} , but decreased by Hg^{2+} and Cu^{2+} . The enzyme degraded γ -cyclodextrin but not α -cyclodextrin. The degree of β -CD degradation by the enzyme was very low. The decomposed products of γ -cyclodextrin by the enzyme were mainly glucose, maltose and a little amount of maltotriose.

*Corresponding author